

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 mai 2009 (07.05.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/056689 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

Villeurbanne (FR). **GUIDERDONI, Emmanuel** [FR/FR];
45, rue des Arnauds, F-34150 Aniane (FR). **BREITLER,**
Jean-Christophe [FR/FR]; 205 rue du Pioch, F-34160
Saint Drezero (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/001785

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.;
Cabinet Ores, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 Paris
(FR).

(22) Date de dépôt international :
29 octobre 2007 (29.10.2007)

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR]; Etablissement public à
caractère scientifique et technologique, 147, rue de
l'Université, F-75007 Paris (FR). **CENTRE DE COOP-**
ERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT
(CIRAD) [FR/FR]; Etablissement Public à caractère
Industriel et Commercial, 42, rue Scheffer, F-75016 Paris
(FR).

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **PETIT,**
Julie [FR/FR]; Résidence Utrillo, Bâtiment A1 - Apt
9024, 30, rue Suzanne Valadon, F-34090 Montpellier
(FR). **DUPORT, Marie-Gabrielle** [FR/FR]; 87, rue du
1er Mars, F-69100 Villeurbanne (FR). **GRESSENT,**
Frédéric [FR/FR]; Chassin, F-01540 Vonnas (FR).
RAHBE, Yvan [FR/FR]; 85, rue des Charmettes, F-69100

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

(54) Title: USE OF A LEGUME ALBUMIN, PA1A, AS AN INSECTICIDE

(54) Titre : UTILISATION D'UNE ALBUMINE PA1A DE LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE

(57) Abstract: The present invention relates to the construction of transgenic plants, in particular of cereals, expressing a legume albumin PA1a. This expression confers thereon an increased resistance to pests, in particular grains pests.

(57) Abrégé : La présente invention concerne la construction des plantes transgéniques, notamment de céréales, exprimant une albumine PA1a de légumineuse. Cette expression leur confère une résistance accrue aux insectes ravageurs, en particulier aux ravageurs de grains.



WO 2009/056689 A1

UTILISATION D'UNE ALBUMINE PA1a DE LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE

La présente invention concerne la construction de plantes transgéniques, notamment de céréales, exprimant une albumine PA1a de légumineuse, et possédant une résistance accrue aux insectes ravageurs, en particulier aux ravageurs des grains.

Plusieurs catégories d'insectes attaquent les grains de céréales, depuis la récolte jusqu'aux produits transformés (par exemple farines, semoules, etc.), en passant par les grains stockés en silos. Ces insectes provoquent des pertes considérables. Par exemple, dans le cas du riz, la perte peut aller jusqu'à 50 % selon certains rapports nationaux, le pourcentage moyen mondial étant de l'ordre de 15 %. Les pertes représentent environ 75 millions de tonnes chaque année, sans tenir compte des pertes associées aux produits dérivés du grain de riz comme la farine.

Les principaux ravageurs, outre les teignes des grains qui appartiennent à l'ordre des Lépidoptères, sont des Coléoptères. Il s'agit essentiellement des charançons (genre *Sitophilus*), des foreurs des grains (genre *Rhyzopertha*), des Coléoptères du grain (genre *Trogoderma* et *Tenebroide*) et des Coléoptères de la farine (genre *Tribolium*) (Heinrichs E., Wiley Eastern Limited Publisher, 1994).

Ces ravageurs détériorent les grains en se nourrissant de l'albumen, causant ainsi des pertes de poids et de qualité, et de l'embryon, provoquant une baisse du taux de germination des lots de grains. Deux catégories d'insectes se développant sur les stocks de grains peuvent être différenciées : les ravageurs primaires qui sont capables de forer et de s'alimenter à partir de grains intacts, et les ravageurs dits secondaires, qui se nourrissent de grains dont l'enveloppe a déjà été percée. Lutter contre les

ravageurs primaires apparaît une stratégie efficace pour réduire les pertes de rendement lors du stockage car elle permet également de limiter les détériorations dues aux ravageurs secondaires.

5 Le charançon du riz, *Sitophilus oryzae* L. (Curculionidés), est un des ravageur primaires les plus dévastateurs des grains de céréales lors de leur stockage. En conditions naturelles, la femelle charançon creuse un trou dans l'enveloppe du grain avec ses
10 mandibules, y dépose un seul œuf et referme le trou à l'aide de mucilage. La larve éclot et se développe à l'intérieur du grain en se nourrissant de l'albumen. La mue larvo-nymphe se déroule à l'intérieur du grain. Le charançon adulte et mature se fraie un chemin en rongant
15 le grain afin d'en émerger, le détruisant ainsi totalement. Cet adulte va ensuite creuser les enveloppes d'autres grains pour se nourrir de leur albumen et de leur embryon, diminuant à son tour la production de riz.

 A l'heure actuelle, la lutte contre ces
20 insectes ravageurs fait principalement appel à l'utilisation d'insecticides. Ceux-ci sont toutefois fréquemment néfastes pour l'environnement et/ou toxiques pour l'homme et les animaux domestiques ; en outre l'apparition de résistance chez les insectes-cible est
25 souvent observée. Par conséquent, trouver des alternatives pour contrôler efficacement ces ravageurs des grains devient urgent.

 Pour remplacer ces insecticides ou limiter leur usage, différentes méthodes ont été proposées [pour
30 revue, cf par exemple F.H ARTHUR, J. Stored Prod. Res., 32, pp. 293-302, (1996)]. Les plus développées actuellement sont des méthodes physiques, telles que le refroidissement des silos, la conservation sous CO₂ ou sous azote ; ces méthodes sont toutefois onéreuses, et
35 leur mise en œuvre, qui nécessite une haute technicité,

est délicate ; elles ne sont donc pas applicables partout.

Une autre approche consiste à augmenter la résistance des plantes aux insectes, en exprimant dans ces plantes une ou plusieurs protéines entomotoxiques. Cette approche, initiée à la fin des années 1980 avec la création des premières plantes transgéniques exprimant des toxines de *Bacillus thuringiensis*, a été depuis exploitée pour augmenter la résistance, face aux insectes attaquant au champ, de diverses plantes d'intérêt agronomique, monocotylédones ou dicotylédones. A titre d'exemples, des riz transgéniques exprimant différentes toxines ont d'ores et déjà fait la preuve de leur résistance au champ vis-à-vis de différents ravageurs, comme les foreurs de tiges (« striped stem borer, SSB », *Chilo suppressalis* ; « yellow stem borer, YSB », *Scirpophaga incertulas*), la tordeuse des feuilles de riz (« rice leaf folder, RLF », *Cnaphalocrocis medinalis*) et les cicadelles (« brown plant hopper, BPH », *Nilaparvata lugens*) (Giri et al., *Biotechnol. Adv.*, 18, 653-683, 2000 ; Bajaj et al., *Plant Biotechnology Journal*, 3, 275-307, 2005). En revanche, bien que plusieurs classes de toxines de *Bacillus thuringiensis* (Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry18, Cry26 et Cry28) présentent une activité entomopathogène vis-à-vis des Coléoptères (Johnson et al., *J. Biosci.*, 21, 673-85, 1996 ; De Maagd et al., *Trends Genet.*, 17, 193-9, 2001), aucune publication n'a à l'heure actuelle, rapporté la création de plantes transgéniques chez lesquelles l'expression de ces toxines conférerait une résistance à ces insectes.

D'autres protéines connues pour leurs propriétés entomotoxiques, et notamment leur toxicité vis-à-vis des charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*) sont les albumines PA1b de légumineuses. Des albumines PA1b ont été mises en évidence initialement chez le pois (Higgins

et al., J. Biol. Chem., 261, 11124-30, 1986), chez le soja (sous la dénomination de leginsuline ; Watanabe et al., Eur. J. Biochem., 224, 167-72, 1994), et ultérieurement, chez d'autres Fabacées appartenant
5 notamment aux genres *Vicia*, *Phaseolus*, et *Glycine* (Louis et al., Plant. Sci., 167, 705-14, 2004; LOUIS et al., Phytochemistry, 68, 521-35, 2007). Il a été observé, notamment chez le pois, que plusieurs isoformes de PA1b peuvent coexister dans une même plante (Demande PCT
10 W0 99/58695 ; Taylor et al., J. Agric. Food. Chem., 52, 7499-506, 2004 ; Taylor et al., J. Agric. Food. Chem., 52, 7491-8, 2004).

Les séquences des protéines PA1b sont fortement conservées ; elles comprennent notamment 11
15 résidus invariants : 5 résidus proline, et 6 résidus cystéine formant 3 ponts disulfure. La structure tertiaire de PA1b (Jouvensal et al., Biochemistry 42, 11915-23, 2003) comprend un nœud formé par les trois ponts disulfures, trois feuillets β anti-parallèles, une
20 boucle L1 contenant la séquence conservée CSPFE, et une boucle L2 dont l'hydrophobicité des acides aminés est conservée. Ces caractéristiques structurales ont permis de classer cette entomotoxine dans la famille des knottines.

25 La Demande PCT W0 99/58695 décrit la mise en évidence de l'activité entomotoxique des albumines PA1b, et leur utilisation comme insecticide, en particulier pour protéger des graines de céréales. Des plants de riz transgéniques exprimant une protéine PA1b de pois,
30 conférant aux graines issues de ces plantes une meilleure résistance vis-à-vis de l'attaque des charançons, ont été produits par les Inventeurs.

PA1b provient de la maturation d'une polyprotéine dénommée PA1 (pour « pea albumin 1 »), ou
35 Albumine I, dont l'expression apparaît limitée aux Fabacées (aucun homologue du gène PA1 codant pour cette

protéine, n'a été détecté chez d'autres familles de plantes). PA1 est composée, en partant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, d'un peptide signal, de la sous-unité b (PA1b) et de son propeptide, de la sous-unité a (PA1a) et de son propeptide. Après clivage endopeptidique du peptide signal de PA1, la proprotéine est adressée dans les corps protéiques de stockage de la graine. Dans ces structures dérivées de vacuoles, les propeptides PA1a et PA1b sont éliminés par des endopeptidases, libérant ainsi deux protéines matures : PA1b et PA1a.

La famille de protéines PA1/Albumine I est référencée dans la base de données InterPro (Mulder et al., Nucleic Acids Research, 35, Database issue D224-D228, 2007 ; <http://www.ebi.ac.uk/interpro>) sous le numéro IPR012512, et dans la base de données Pfam (FINN et al., Nucleic Acids Research, 34, Database issue D247-D251, 2006 ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>), sous le numéro Pfam0827. Dans le cadre de l'exposé de la présente invention, le terme « PA1 » désigne toute protéine de cette famille PA1/Albumine I ; les termes « PA1a » et « PA1b » désignent respectivement les formes matures des sous-unités a et b d'une protéine PA1.

Un alignement établi à partir de séquences de protéines PA1 disponibles dans les bases de données est représenté sur la Figure 1. L'organisme d'origine et le numéro d'accèsion EMBL ou GenBank sont indiqués pour chaque protéine. Seules les séquences issues du pois (*Pisum sativum*), de *Medicago truncatula*, et du soja (*Glycine max*) (excepté CAE00463) sont complètes, les séquences PA1a issues des autres Fabacées n'étant que partiellement connues. Les régions correspondant au peptide signal et aux formes matures des sous-unités PA1a et PA1b sont encadrées en trait plein, celles correspondant aux propeptides de PA1b et PA1a sont encadrées en pointillés. La délimitation entre la

protéine et son propeptide n'est connue que chez le pois; elle n'est donc pas indiquée pour les isoformes de la protéine PAla présentes chez les autres Fabacées.

L'alignement de la Figure 1 montre que la
5 séquence de PAla est très conservée chez les Fabacées, en particulier au niveau de sa portion N-terminale. Cependant, aucune fonction biologique, autre que celle de protéine de réserves, n'a été attribuée jusqu'à présent à PAla. Contrairement à PAlb, PAla a été décrite comme ne
10 possédant pas de propriétés entomotoxiques (S. LOUIS : Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type lb des graines de Légumineuses. Thèse de doctorat, INSA de Lyon, 2004).

Les Inventeurs ont maintenant constaté que, de
15 manière surprenante, les graines de plants de riz transgéniques exprimant la protéine PAla, et n'exprimant pas la protéine PAlb possédaient une résistance accrue aux attaques de charançons, plus particulièrement de charançons adultes, par rapport aux graines issues de
20 plants non transformés.

La présente invention a en conséquence pour objet un procédé pour améliorer la résistance d'une plante aux attaques d'insectes ravageurs, en particulier des insectes ravageurs des grains, caractérisé en ce que
25 l'on exprime dans ladite plante une séquence codant pour une protéine PAla, placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié dans une cassette d'expression ne comprenant pas de séquence codant pour une protéine PAlb.

30 Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ladite cassette d'expression comprend une séquence codant pour une protéine PAla dont la séquence des 28 acides aminés N-terminaux possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre
35 croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de

préférence au moins 70%, et par ordre croissant de
préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de
similarité avec la séquence des 28 acides aminés N-
terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1 ci
5 après :

DEHPNLCESDADCRKKGSGKFCGHYPNPGIEYGWCFASKSEAEDFFSKITQKD

La séquence SEQ ID NO: 1, utilisée ici comme
séquence de référence, est celle de la forme mature de la
sous-unité PA1a de l'isoforme de PA1 de *Pisum sativum*
10 définie par la séquence EMBL CAE00465 (également
SwissProt P62931). La séquence SEQ ID NO: 1 correspond
aux acides aminés 70-122 de la séquence EMBL CAE00465.

Sauf indication contraire, les pourcentages
d'identité et de similarité auxquels il est fait
15 référence dans le cadre de l'exposé de la présente
invention sont déterminés sur un alignement global des
séquences à comparer, en utilisant l'algorithme de
NEEDLEMAN et WUNSCH (J. Mol. Biol. 48, 443-453, 1970).
Cette comparaison de séquences peut être effectuée par
20 exemple à l'aide de la suite EMBOSS (RICE et al., Trends
in Genetics, 16, 276-277, 2000), en utilisant les
paramètres suivants : matrice BLOSUM62, ouverture de
brèche : 10 ; extension de brèche 0,5.

De manière avantageuse, la séquence des 28
25 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PA1a est
définie par la séquence générale (I) suivante (SEQ ID
NO : 11) :

X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-S-G-X₁₄-F-C-
X₁₅-X₁₆X₁₇-P-N-X₁₈

30 dans laquelle H, C, K, S, G, F, P et N ont
leur signification usuelle en code 1-lettre ;

X₁ représente un acide aminé choisi parmi
l'aspartate, le glutamate et la lysine, et de préférence
parmi le glutamate et l'aspartate ;

X₂ représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la glutamine, l'aspartate, le glutamate, la lysine ; de préférence X₂ représente le glutamate ;

5 X₃ représente un acide aminé choisi parmi la proline, la leucine et l'alanine ; de préférence X₃ représente la proline ;

X₄ représente l'asparagine ou l'histidine, de préférence l'asparagine ;

10 X₅ représente la leucine ou l'isoleucine, de préférence la leucine ;

X₆ représente un acide aminé choisi parmi la glutamine, le glutamate et la lysine, de préférence parmi la glutamine ou le glutamate ;

15 X₇ représente la sérine ou la thréonine, de préférence la sérine ;

X₈ représente un acide aminé choisi parmi l'asparagine, l'aspartate et l'histidine ; de préférence X₈ représente l'aspartate ;

20 X₉ représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la valine, la leucine, l'aspartate et le glutamate, de préférence parmi l'alanine ou l'aspartate ;

X₁₀ représente l'aspartate ou le glutamate ;

25 X₁₁ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'arginine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, et la thréonine, de préférence parmi l'arginine ou la lysine ;

X₁₂ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'asparagine et le glutamate ; de préférence X₁₂ représente la lysine ;

30 X₁₃ représente un acide aminé choisi parmi la glycine, le glutamate et l'arginine ; de préférence X₁₃ représente la glycine ;

35 X₁₄ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'asparagine, la thréonine, la sérine et l'aspartate, de préférence parmi la lysine, l'asparagine, ou la thréonine ;

X₁₅ représente la glycine ou l'alanine ;

X₁₆ représente l'histidine ou l'arginine ;

X₁₇ représente la tyrosine ou la phénylalanine, de préférence la tyrosine ;

5 X₁₈ représente un acide aminé choisi parmi la proline, l'asparagine, l'aspartate, l'histidine et l'alanine, de préférence parmi la proline ou l'asparagine.

De manière avantageuse, la séquence des 31
10 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PA1a possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de
15 préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence des 31 acides aminés N-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1. De préférence, cette séquence de 31 acides aminés N-terminaux est définie par la séquence générale (II)
20 suivante (SEQ ID NO : 12) :

X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-S-G-X₁₄-F-C-X₁₅-X₁₆-X₁₇-P-N-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁

dans laquelle X₁ à X₁₈ sont tels que définis ci-dessus, H, C, K, S, G, F, P et N ont leur
25 signification usuelle en code 1-lettre, et :

X₁₉ représente un acide aminé choisi parmi la glycine, l'aspartate ou la tyrosine, de préférence parmi la glycine ou l'aspartate ;

X₂₀ représente une isoleucine ou une
30 méthionine, de préférence une isoleucine ;

X₂₁ représente l'aspartate ou le glutamate, de préférence l'aspartate.

De manière particulièrement préférée, la séquence des 36 acides aminés N-terminaux de ladite
35 protéine PA1a possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence des 36 acides aminés N-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1. De préférence cette séquence de 36 acides aminés N-terminaux est définie par la séquence générale (III) suivante (SEQ ID NO : 13) :

$X_1-X_2-H-X_3-X_4-X_5-C-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}-K-X_{13}-S-G-X_{14}-F-C-$
 $X_{15}-X_{16}X_{17}-P-N-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-G-W-C-F$

dans laquelle X_1 à X_{21} sont tels que définis ci-dessus, H, C, G, K, S, G, F, P, W, et N ont leur signification usuelle en code 1-lettre, et X_{22} représente une tyrosine ou une histidine, de préférence une tyrosine.

De manière encore plus préférée, la séquence des 42 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PAla possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence des 42 acides aminés N-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1. De préférence cette séquence de 42 acides aminés N-terminaux est définie par la séquence générale (IV) suivante (SEQ ID NO : 14) :

$X_1-X_2-H-X_3-X_4-X_5-C-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}-K-X_{13}-S-G-X_{14}-F-C-$
 $X_{15}-X_{16}X_{17}-P-N-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-G-W-C-F-X_{23}-S-X_{24}-X_{25}-X_{26}-A$

dans laquelle X_1 à X_{22} sont tels que définis ci-dessus, A, H, C, G, K, S, G, F, P, W, et N ont leur signification usuelle en code 1-lettre, et :

X_{23} représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par l'alanine, la glycine, la sérine et l'aspartate, de préférence l'alanine ;

X₂₄ représente un acide aminé choisi dans la groupe constitué par la lysine, l'asparagine et l'aspartate, de préférence la lysine ;

5 X₂₅ représente la sérine ou la phénylalanine, de préférence la sérine ;

X₂₆ représente le glutamate ou la lysine, de préférence le glutamate.

De manière tout particulièrement préférée, la séquence de ladite protéine PA1a possède au moins 55%, de
10 préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence
15 SEQ ID NO : 1. De préférence, ladite protéine PA1a est définie par la séquence générale (V) suivante (SEQ ID NO : 15) :

X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-
S-G-X₁₄-F-C-X₁₅-X₁₆-X₁₇-P-N-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-G-W-C-F-X₂₃-S-X₂₄-
20 X₂₅-X₂₆-A-X₂₇-X₂₈-X₂₉-F-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆

dans laquelle dans laquelle X₁ à X₂₆ sont tels que définis ci-dessus, A, H, C, G, K, S, G, F, P, W, et N ont leur signification usuelle en code 1-lettre, et :

25 X₂₇ représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par le glutamate, la glutamine, la tyrosine et la leucine ; de préférence X₂₇ représente le glutamate ;

30 X₂₈ représente un acide aminé choisi parmi le glutamate, l'aspartate, et la lysine ; de préférence X₂₈ représente l'aspartate ;

X₂₉ représente un acide aminé parmi la glycine, la valine et la phénylalanine, de préférence parmi la valine et la phénylalanine ;

35 X₃₀ représente un acide aminé choisi parmi la sérine, la leucine et la phénylalanine ; de préférence X₃₀ représente la sérine ;

X₃₁ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'asparagine et l'alanine ; de préférence X₃₁ représente la lysine ;

5 X₃₂ représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par l'isoleucine, la valine et la méthionine ; de préférence X₃₂ représente l'isoleucine ;

X₃₃ représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la thréonine, la sérine et la proline ; de préférence X₃₃ représente la thréonine ;

10 X₃₄ représentant un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la glutamine, la proline, la sérine et l'arginine ; de préférence X₃₄ représente la glutamine ou la proline ;

15 X₃₅ représentant un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la lysine, l'asparagine et l'alanine ; de préférence X₃₅ représente la lysine ;

20 X₃₆ représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par l'aspartate, l'arginine, la proline et la thréonine ; de préférence X₃₆ représente l'aspartate.

A titre d'exemples non-limitatifs, ladite protéine PA_{1a} peut être choisie parmi les sous-unités PA_{1a} des isoformes de PA₁ de *Pisum sativum* dont les séquences sont disponibles sous les références EMBL
25 CAE00465, CAE00466, CAE00467, CAE00468, CAB82859, et GenBank AAA33638, AAA33639.

La séquence de la sous-unité PA_{1a} de la protéine CAE00466 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 2; la
30 séquence de la sous-unité PA_{1a} de la protéine CAE00467 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3 ; la séquence de la sous-unité PA_{1a} de la protéine CAE00468 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:
35 4 ; la séquence de la sous-unité PA_{1a} de la protéine CAB82859 est représentée dans la liste de séquences en

annexe sous le numéro SEQ ID NO:5 ; la séquence de la sous-unité PA1a de la protéine AAA33638 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:6 ; la séquence de la sous-unité PA1a de la protéine AAA33639 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:7.

Le cas échéant, ladite protéine PA1a peut être modifiée par l'addition à son extrémité N-terminale d'un polypeptide constitué de deux à dix résidus, de préférence un dipeptide de séquence (code 1 lettre): MN.

Les protéines PA1a modifiées de la sorte, font également partie, en tant que telles, de l'objet de la présente invention.

La présente invention a également pour objet des cassettes d'expression utilisables pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention.

Les cassettes d'expression conformes à l'invention comprennent une séquence codant pour une protéine PA1a, sous forme native ou sous forme modifiée, telles que définies ci-dessus. Cette séquence peut coder pour la protéine PA1a mature, ou pour son précurseur, comprenant le propeptide C-terminal de PA1a. La présence de ce propeptide n'est toutefois pas indispensable pour l'expression de PA1a, ni pour son activité entomotoxique.

Elles peuvent également comprendre d'autres séquences codantes, à l'exclusion de toute séquence codant pour PA1b.

Les séquences codantes utilisées dans les cassettes d'expression conformes à l'invention peuvent optionnellement être modifiées, par exemple dans le cadre de l'expression chez des monocotylédones, afin d'optimiser l'expression en tenant compte des préférences de codons de la plante-hôte choisie (Murray et al. Nucleic Acids Research, 17, 477 498 (1989)).

Les cassettes d'expression conformes à l'invention contiennent également un promoteur approprié

contrôlant la transcription de la séquence codante, et généralement, un terminateur de transcription.

De très nombreux promoteurs fonctionnels dans des cellules végétales sont connus en eux-mêmes ; le
5 choix du promoteur le plus approprié est effectué de manière classique par l'homme du métier, en fonction par exemple de critères tels que les plantes-hôtes choisies, et le profil spatial et/ou temporel d'expression recherché.

10 Par exemple, on peut choisir un promoteur constitutif, tel que le promoteur 35S du CaMV ou l'un de ses dérivés, ou le promoteur de l'actine ou de celui l'ubiquitine, etc. On peut également choisir un producteur inductible ou bien un promoteur tissu-
15 spécifique, afin d'exprimer préférentiellement ou exclusivement la protéine d'intérêt à certains stades du développement de la plante, dans certaines conditions environnementales, ou dans certains tissus ou organes cibles.

20 A titre d'exemples non-limitatifs de promoteurs inductibles utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention, on citera le promoteur du gène *pin2* de pomme de terre (Potato protease inhibitor II) (Xu D et al., Plant. Mol. Biol., 22, 573-88, 1993 ; Duan et
25 al., Nat. Biotechnol., 14, 498-8, 1996) et le promoteur du gène *mpi* (Protease inhibitor protein) (Cordero et al., Plant. J., 6, 141-50, 1994).

A titre d'exemples non-limitatifs de promoteurs tissu-spécifiques utilisables pour la mise en
30 œuvre de la présente invention, on citera par exemple des promoteurs s'exprimant préférentiellement dans les grains tels que les promoteurs REG-2 et Ole18 (Qu le Q, Takaiwa F, Plant Biotechnol. J., 2, 113-25, 2004).

Le terminateur de transcription peut être
35 n'importe quel terminateur fonctionnel dans une cellule végétale : parmi les plus communément utilisés, on citera

par exemple le terminateur 35S de CaMV, ou le terminateur NOS de la nopaline synthase.

Le cas échéant, les cassettes d'expression conformes à l'invention peuvent comprendre en outre
5 d'autres éléments, tels que des séquences « enhancer », des introns, ou des séquences de tête (leader sequences), usuellement employés dans ce type de constructions pour augmenter l'expression du gène d'intérêt.

La présente invention a également pour objet
10 tout vecteur recombinant, résultant de l'insertion d'une cassette d'expression conforme à l'invention dans un vecteur hôte.

Parmi la très grande variété de vecteurs-hôtes disponibles, le choix du vecteur le plus approprié sera
15 effectué, de manière classique, par l'homme du métier en fonction notamment de critères tels que la cellule ou l'organisme hôte choisi, le protocole de transformation envisagé, etc.

Des vecteurs recombinants conformes à
20 l'invention peuvent également comprendre des séquences permettant le suivi de la transformation, et l'identification et/ou la sélection des cellules ou organismes transformés. Il s'agit notamment de gènes rapporteurs, conférant à ces cellules ou organismes un
25 phénotype aisément reconnaissable, ou bien de gènes marqueurs de sélection : seuls les cellules ou organismes exprimant un gène marqueur de sélection déterminé, sont viables dans des conditions données (conditions sélectives). Des gènes rapporteurs fréquemment employés
30 sont par exemple celui de la bêta-glucuronidase (GUS), celui de la luciférase, ou celui de la "green fluorescent protein" (GFP). Des gènes marqueurs de sélection sont généralement des gènes de résistance à un antibiotique, ou également, dans le cas des plantes ou des cellules
35 végétales, à un herbicide. Il existe une très grande variété de gènes marqueurs de sélection parmi lesquels

l'homme du métier peut effectuer son choix en fonction des critères qu'il aura lui-même déterminés.

La présente invention englobe également des cellules-hôtes transformées par un vecteur recombinant
5 conforme à l'invention.

On entend ici par cellule ou organisme transformé par une cassette d'expression, toute cellule ou organisme dont le contenu génétique a été modifié par transfert de ladite cassette d'expression dans ladite
10 cellule ou ledit organisme, quelle que soit la méthode de transfert qui a été utilisée, et que l'information génétique apportée par ladite cassette soit intégrée dans l'ADN chromosomique ou demeure extra-chromosomique.

Les cellules hôtes peuvent être des cellules
15 procaryotes, ou eucaryotes. Dans le cas de cellules procaryotes, il peut par exemple s'agir d'*E. coli*, ou d'Agrobactéries telles qu'*Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. Dans le cas de cellules eucaryotes, il peut s'agir notamment de cellules
20 végétales, qui peuvent être issues de plantes dicotylédones ou monocotylédones.

La présente invention a également pour objet un procédé pour obtenir une plante transgénique exprimant une protéine PAla, caractérisé en ce qu'elle comprend les
25 étapes suivantes :

- la transformation de cellules végétales par une cassette d'expression conforme à l'invention ;
- la régénération de plantes à partir des cellules transformées ;
- 30 - la sélection des plantes ayant intégré dans leur génome ladite cassette d'expression.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, des techniques très nombreuses de transformation de cellules végétales germinales ou
35 somatiques, (isolées, sous forme de cultures de tissus ou d'organe, ou sur la plante entière), et de régénération

des plantes sont disponibles. Le choix de la méthode la plus appropriée dépend généralement de la plante concernée.

A titre d'exemples non-limitatifs, on citera
5 la transformation de protoplastes en présence de polyéthylèneglycol, l'électroporation, l'utilisation d'un canon à particules, la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire, ou la transformation par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*. Dans le cas des plantes monocotylédones
10 on utilisera préférentiellement la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

La présente invention a également pour objet les plantes transgéniques comprenant dans leur génome au moins une copie d'une cassette d'expression conforme à
15 l'invention.

On définit ici comme plante transgénique une plante transformée chez laquelle l'information génétique exogène apportée par un polynucléotide transformant est intégrée de manière stable dans l'ADN chromosomique, sous
20 forme de transgène, et peut ainsi être transmise aux descendants de ladite plante. Cette définition englobe donc également les descendants des plantes résultant de la transgénèse initiale, dès lors qu'ils contiennent dans leur génome une copie du transgène.

25 Les plantes transgéniques conformes à l'invention expriment une protéine PA1a dans la plante entière, ou au moins dans leurs graines, et le cas échéant dans d'autres tissus ou organes. Cette expression de PA1a confère aux tissus et organes concernés une
30 toxicité vis-à-vis d'insectes ravageurs, et augmente donc leur résistance aux attaques de ces insectes. Les insectes concernés sont notamment les adultes d'insectes ravageurs des grains, notamment des coléoptères, et plus particulièrement des charançons, en particulier du genre
35 *Sitophilus*, et plus particulièrement *Sitophilus oryzae*.

Pour augmenter leur niveau ou accroître leur spectre de résistance vis-à-vis des insectes, des plantes transgéniques conformes à l'invention peuvent également comprendre, le cas échéant, un ou plusieurs autre(s) gènes codant pour une ou plusieurs autre(s) entomotoxines. A titre d'exemples on citera les toxines Cry3 de *Bacillus thuringiensis*, notamment Cry3A, des inhibiteurs de protéases, des toxines Vip, l'avidine, des lectines.

La présente invention s'applique à toutes les plantes qui n'expriment pas naturellement PA1a. Elle présente un intérêt tout particulier chez les céréales, telles que le blé, le maïs ou le riz.

Le matériel végétal (protoplastes, cals, boutures, semences, etc...) obtenu à partir des cellules transformées ou des plantes transgéniques conformes à l'invention fait également partie de l'objet de la présente invention. L'invention englobe également les produits obtenus à partir des plantes conformes à l'invention, notamment les graines et leurs produits dérivés, par exemple farines ou semoules.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre qui se réfère à un exemple non-limitatif, illustrant l'obtention de riz transgénique exprimant une albumine PA1a de pois, et dont les graines possèdent une résistance accrue aux attaques de charançons.

EXEMPLE 1 : OBTENTION DE PLANTS DE RIZ TRANSGENIQUES EXPRIMANT PA1A

1) Isolement de la séquence codant pour PA1a, avec ou sans son propeptide.

Les séquences codant pour la protéine PA1a, avec ou sans son propeptide, ci-après respectivement appelées PA1a-PP et PA1a, ont été amplifiées à partir de la séquence du gène *pal* dont le numéro d'accension

GenBank est AJ574794, respectivement à l'aide des couples d'amorces spécifiques SEQ ID NO : 8 (5' GGATCCATGAATGATGAACACCCTAACT 3') et SEQ ID NO : 9 (5' GGTACCTTAAGCAGTGGAAACACTCTTCA 3') et des amorces SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 10 (5' GGTACCTTAGTCTTTTGGGGTAATCTTAGAGAA 3'). Les séquences ainsi amplifiées ont une taille respective de 204 pb et 180 pb.

2) Construction du vecteur d'expression pC5300 Ubi-PAla-Tnos

Une cassette d'expression Ubi-Tnos constituée du promoteur, du premier intron et du premier exon du gène de l'ubiquitine ubi-1 du maïs (Christensen et al., Plant Mol. Biol., 18, 675-89, 1992 ; Cornejo et al. Plant Mol. Biol., 23, 567-81, 1993) et du terminateur du gène de la nopaline synthétase (Tnos ; DEPICKER et al., J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573, 1982 ; Bevans et al., Nucleic acids Res., 11, 369-85, 1983) a été générée, puis clonée dans le site de clonage multiple du plasmide pC5300 (numéro d'accèsion GenBank AF294976), plasmide porteur du gène de résistance à la kanamycine, générant ainsi le vecteur pC5300 Ubi-Tnos.

Les séquences codant pour la protéine PAla et pour la protéine PAla-PP à tester, obtenues comme décrit en 1) ci-dessus, ont ensuite été clonées individuellement dans le vecteur pC5300 Ubi-Tnos de sorte que l'expression de PAla soit sous contrôle du promoteur de l'ubiquitine. Pour cela, le vecteur pC5300 Ubi-Tnos a été clivé par les enzymes *Bam*HI et *Kpn*I puis la séquence codante pour la protéine PAla a été introduite aux sites correspondants, générant les vecteur pC5300 Ubi-PAla-Tnos et pC5300 Ubi-PAla-PP-Tnos. Lors des étapes de clonage, les séquences PAla et PAla-PP ont été modifiées avec pour conséquence l'ajout à leur extrémité N-terminale d'une méthionine et d'un résidu asparagine qui correspond au dernier acide aminé du propeptide de PAlb. La Figure 2 montre une

représentation schématique du vecteur pC5300 Ubi-PAla-Tnos. Les séquences essentielles à la réplication du vecteur dans *E. coli* sont représentées en gris foncé, les séquences nécessaires à la réplication dans *Agrobacterium tumefaciens* sont représentées en gris plus clair (pVS1 rep et pVS1 sta).

3) Introduction du vecteur pC5300 Ubi-PAla-Tnos dans *Agrobacterium tumefaciens*

Une suspension de bactéries électrocompétentes (20 µL), *Agrobacterium tumefaciens* souche EHA105, est déposée entre les électrodes d'une cuve à électroporation (Invitrogen). 1 à 2 µL d'une solution d'ADN plasmidique (vecteur pC5300 Ubi-PAla-PP-Tnos ou vecteur pC5300 Ubi-PAla-Tnos) (2 à 10 ng) sont ajoutés délicatement dans les 20 µL de suspension d'*Agrobacterium*. La cuve à électrodes est ensuite fermée et placée dans l'électroporateur (Invitrogen), préalablement réglé sur 330 µF, 400 V, 4 kΩ. Une impulsion électrique est appliquée permettant de dépolariser les phospholipides de la membrane plasmique des cellules d'*Agrobacterium* afin d'y introduire par diffusion le plasmide d'intérêt. Après électroporation, la suspension de bactéries est prélevée puis incubée dans 500 µL de milieu LB sous agitation (250 rpm) à 28°C pendant 2h. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu gélosé additionné de rifampicine (75 mg.L⁻¹) dont le gène de résistance est porté par la souche EHA105 et de l'antibiotique dont le gène de résistance est porté par le plasmide transféré, ici la kanamycine (50 mg.L⁻¹). Après deux nuits d'incubation à 28°C, seules les bactéries ayant incorporé le plasmide d'intérêt se seront divisées et auront formé des colonies. Ces colonies sont ensemencées dans 10 mL de LB/rifampicine/kanamycine en vue d'une extraction du plasmide pour vérifier son intégrité.

4) Obtention des modules embryogènes

Des nodules embryogènes ont été générés comme suit :

Des grains de riz de la variété *Japonica ZhongZuo321* débarrassés de leurs glumes et glumelles sont
5 rincés 1 min dans 100 mL d'éthanol 70%. Ils sont ensuite désinfectés par un traitement à l'hypochlorite de sodium commercial à 30% durant 30 min. Durant cette étape, les grains sont agités toutes les 5 min. Ils sont ensuite
10 rincés abondamment avec 2 à 3 litres d'eau distillée stérile. Les grains sont ensuite déposés dans des boîtes de pétri (Optilux 100x20 mm) contenant le milieu d'induction NB à raison de 10 grains par boîte. Les boîtes de culture sont mises en incubation à l'obscurité
15 à 28°C pendant 20 jours. A la fin de cette période, la prolifération des cellules du scutellum des grains de riz a généré un cal qui a libéré de petits nodules. Les nodules sphériques et compacts de 0,5 à 1 mm sont transférés sur le milieu NB à raison de 30 à 50 par boîte
20 de pétri (Optilux 100x15 mm) pendant 10 jours à l'obscurité à 28°C. Ces nodules prolifèrent pour former des cals qui se fragmentent en nodules de taille variable. Les nodules obtenus sont ensuite sélectionnés pour la transformation.

5) Transformation génétique du riz

La séquence codant pour PA1a, ou la séquence codant pour PA1a et son propeptide, (PA1a-PP), sous contrôle du promoteur du gène de l'ubiquitine-1 du maïs a été introduite chez le riz par transformation génétique
30 de cals embryogènes de la variété *Japonica ZhongZuo321* (ci-après abrégé ZZ321) via *Agrobacterium tumefaciens*.

Préparation du matériel végétal

La sélection des unités embryogènes pour la coculture est réalisée avant la préparation de la
35 solution d'*Agrobacterium*. Seuls les nodules sphériques,

blancs et opaques, présentant une surface rugueuse, de taille comprise entre 3 et 5 mm sont utilisés pour la coculture afin de garantir aux explants un stade physiologique optimal pour la transformation. Une trentaine d'unités embryogènes sont utilisées par construction à transférer et sont rassemblées dans une boîte de milieu NB ce qui permet de débiter la coculture liquide de façon synchrone.

Préparation des souches d'*Agrobacterium*

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant la construction à transférer chez le riz, est réalisée. 3 mL de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés (ici rifampicine (75 mg.L⁻¹) et kanamycine (50 mg.L⁻¹) sont ensemencés par une colonie bactérienne et placés à 28°C pendant une à deux nuit(s) sous agitation constante (250 rpm). Puis, 200 µL de la suspension bactérienne sont étalés sur une boîte de milieu AB contenant les antibiotiques appropriés. Deux boîtes de milieu AB sont ensemencées par construit à transférer. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 jours.

Transformation

Les bactéries s'étant développées sur les boîtes de milieu AB sont collectées avec une spatule et transférées dans 30 mL de milieu R2-CL contenu dans un tube de 50 mL. Le tube est vortexé jusqu'à homogénéisation puis un aliquot de 1 mL est utilisé pour mesurer la DO à 600 nm (une dilution peut-être réalisée pour une mesure plus précise). La DO doit être comprise entre 0,1 et 1 (densité 3-5 x 10⁹). 25 mL de suspension bactérienne sont alors transférés dans une boîte de pétri (Optilux 100x20 mm). La trentaine de cals est immergée pour une durée de 15 min avec une légère agitation manuelle. Les cals sont ensuite transférés sur une pile de huit feuilles rectangulaires de papier Whatman n°1 autoclavées, puis roulés sur toute la longueur de trois

feuilles successives jusqu'à un séchage complet (absence d'humidité au contact du papier). Le séchage des cals est un point critique qui doit permettre d'éviter tout surdéveloppement bactérien. Les cals sont ensuite transférés à raison de dix par boîte sur 20 mL de milieu R2-CS. Les boîtes scellées avec du parafilm sont mises en incubation pendant trois jours à l'obscurité à 25°C.

Sélection et régénération

Les cals, à l'issue de la coculture, sont transférés à la même densité sur le milieu de sélection R2S (boîte de pétri Optilux 100x20 mm). Les cals enveloppés d'un mucilage visqueux résultant d'un surdéveloppement bactérien au cours de la coculture sont éliminés. Les boîtes sont mises en incubation à l'obscurité à 28°C. Au cours de ces deux semaines, certains cals cocultivés vont se nécroser, d'autres vont être « englués » dans un surdéveloppement bactérien. A l'issue des deux semaines de sélection, de petites proliférations blanches se développent sur toute la surface des cals cocultivés, qui ont bruni. Les cals cocultivés sont alors transférés sur milieu NBS (boîte Optilux 100x20 mm), à raison de six cals par boîte, et les boîtes sont mises à incuber à l'obscurité à 28°C. Après une semaine, les boîtes sont ouvertes et les proliférations, qui se présentent à présent sous forme de globules, sont étalées tout autour du cal cocultivé d'origine, de façon à les placer au contact du milieu sélectif. Les boîtes sont ensuite remises en incubation dans les mêmes conditions. Après une semaine, les proliférations globulaires étalées se sont développées pour former des cals résistants de taille supérieure aux autres proliférations, compacts, de couleur jaune-blanche et d'aspect rugueux. Les cals demeurant translucides et de taille inférieure, de couleur beige, de consistance plus molle et aux contours moins définis sont considérés comme non transgéniques. Les cals résistants sont

transférés sur le milieu de prérégénération PR-AG contenant 50 mg.L⁻¹ d'hygromycine en boîte de pétri (Optilux 100x15 mm) et mis en incubation à l'obscurité à 28°C pendant 8 jours. Les cals transgéniques augmentent de taille et deviennent compacts, opaques, de couleur crème à légèrement jaune, de structure lobée et invaginée. Les rares cals qui ne se développent pas ou peu sont éliminés. Les cals sont transférés sur milieu de régénération (RN) à raison de 5 par boîte de pétri (Optilux 100x20 mm), conservés deux jours à l'obscurité, puis transférés à la lumière sous une intensité de 110-130 $\mu\text{M}/\text{mPAR}$ à 28°C. Les cals deviennent alors plus compacts et blancs et sont transférés sous lumière continue.

15 **Développement et sevrage**

Après trois semaines d'exposition à la lumière, les cals ont verdi et ont développé des tiges et des racines. Ces jeunes plantules de 2 à 5 cm sont transférées dans des tubes contenant 20 mL de milieu MS et placées dans les mêmes conditions de culture pendant 15 à 20 jours. Une fois que ces plantules ont formé un important réseau racinaire et que les feuilles atteignent le haut du tube, elles sont repiquées en pots de 1 litre dans un mélange de terreau et de pouzolane. Les plantules sont ensuite placées en serre de confinement. Les conditions sont celles de jours courts avec 11h30 d'éclairement à 400 $\mu\text{mol E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ à 25°C sous 75% d'humidité.

EXEMPLE 2 : CARACTERISATION DES RIZ TRANSFORMES

30 **1) Détection des transcrits de PA1a et PA1a-PP**

Lors du transfert des plantes régénérées en serre, les feuilles de 24 transformants primaires du construit et des feuilles du témoin non transgénique (ZZ321) ont été prélevées afin d'extraire les ARN totaux puis de les analyser par RT-PCR. Cette analyse a donc été

effectuée à partir des ARN totaux extraits des feuilles de l'ensemble de la population T0 afin de déterminer si la séquence codant pour PA1a ou PA1a-PP introduite dans le riz était correctement transcrite.

5 L'extraction des ARN totaux est réalisée comme suit :

200 mg de feuilles sont placées en présence de deux billes de verre dans un microtube de plaque 96 puits préalablement dans l'azote liquide, soumis au broyage automatique (MM300 Mixer Mill, Retsch) réalisé à 30Hz, 10 deux fois 2 minutes. Les plaques sont ensuite placées dans la glace et 500 µL de TRI REAGENT (Sigma) sont ajoutés à chaque échantillon puis homogénéisée par retournement. Les plaques sont centrifugées 30 min à 15 5500 g à 4°C. Ensuite, les ARN totaux sont extraits par une méthode classique, par exemple au phénol/chloroforme.

Les ARN totaux sont rétrotranscrits en ADNc selon des techniques standards puis la réaction de polymérisation en chaîne est réalisée à l'aide des 20 amorces SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 9 en ce qui concerne la construction PA1a-PP et d'autre part avec les amorces SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 10 en ce qui concerne PA1a. La taille des produits d'amplification attendue est de 204 pb pour la construction PA1a-PP et 180 pb pour la 25 construction PA1a.

La Figure 3 montre l'analyse électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR des ARN totaux des plantes transformées par PA1a-PP (Fig.3A) ou PA1a (Fig.3B). Les pistes 1, 2 et 3 sont des témoins 30 correspondant respectivement à des ARN totaux extraits de feuilles de la variété ZZ321 ayant subi une étape de PCR, les même ARN ayant subi une RT-PCR et le produit d'une RT-PCR en absence d'ARN totaux. Les pistes 4 et 5 et les pistes 6 et 7 correspondent à deux échantillons 35 indépendants de la construction analysée. Pour chaque échantillon, la première piste correspond aux ARN totaux

ayant subi uniquement la PCR (puits 4 et 6), la seconde piste correspond aux ARN totaux ayant subi la RT-PCR (puits 5 et 7) : la première piste sert à détecter une éventuelle contamination des extraits d'ARN totaux par de l'ADN génomique.

L'amplification réalisée par RT-PCR sur les échantillons d'ARN totaux issus des plantes transformées par PAIa-PP révèle la présence d'un produit d'amplification d'environ 200 pb dans le cas des extraits de plantes transformées par PAIa-PP (Fig.3A, pistes 5 et 7), ce produit n'étant pas présent dans les différents échantillons témoins (pistes 1, 2, 3, 4 et 6). Il apparaît donc que les plantes transgéniques transformées par la construction PAIa-PP ont bien intégré dans leur génome la séquence codant pour le polypeptide PAIa-PP et que cette dernière est correctement transcrite.

La même analyse peut être faite en ce qui concerne les plantes transformées par PAIa, notamment en comparant la piste 7 qui présente un produit d'amplification d'environ 180 pb aux pistes témoins 6, 1, 2 et 3 de la Figure 3B.

Les plantes transgéniques transformées par la construction PAIa ont bien intégré dans leur génome une séquence codant pour le polypeptide PAIa correctement transcrite.

2. Détection de l'expression de PAIa

La détection du polypeptide PAIa a été réalisée sur la génération T1 de la lignée de grain de riz transgénique T0 positive en lors de l'analyse par RT-PCR par la méthode du Western *in situ* en adaptant le protocole décrit par Qu et al., Plant Cell Rep., 22, 282-5, 2003.

Brièvement, des grains décortiqués de riz et de pois sont placés dans une plaque 24 puits et imbibés dans de l'eau bidistillée pendant 16h à 4°C. Les grains imbibés sont sectionnés longitudinalement de façon à

sectionner l'embryon par le milieu, puis mis en contact avec de l'acétone pendant 30 sec. Toutes les étapes suivantes ont lieu sous agitation à température ambiante. Les demi-grains sont ensuite rincés avec de l'eau bidistillée et incubés dans une solution de lavage (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 2%) pendant 30 min. Les demi-grains sont rincés dans le tampon TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05%) durant 30 min. Après trois rinçages de 5 min chacun dans le tampon TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM), les échantillons sont incubés dans une solution de blocage (Western Blocker Solution, Sigma) pendant au minimum 3h. Les demi-grains sont placés pendant 16h dans la solution d'anticorps primaire polyclonal anti PAla (Le Gall et al., J. Nutr., 135, 1215-22, 2005) dilué 500 à 2 500 fois dans le tampon TBS. Les échantillons sont ensuite rincés dans le tampon TBST pendant 15 min puis trois fois durant 5 min dans du tampon TBS. Les demi-grains sont incubés pendant 2h dans la solution d'anticorps secondaire (Goat anti-rabbit IgG-AP conjugate, Bio-rad) dilué 2 000 à 5 000 fois dans le tampon TBS. Après un rinçage dans du tampon TBST et 3 rinçages dans du tampon TBS, identiques à ceux décrits précédemment, les demi-grains sont finalement mis en présence d'un mélange de réactifs (Alcaline Phosphatase Conjugate Substrate kit, Bio-rad). La phosphatase alcaline portée par l'anticorps secondaire va catalyser la production d'un précipité coloré en brun qui permet, ici, de localiser la protéine recherchée sur le demi-grain de riz ou de pois.

La Figure 4 représente des photographies de demi-grains après analyse par Western *in situ* : la Figure 4A représente une graine de pois (témoin positif), la Figure 4B représente un grain de riz ZZ321 sauvage (témoin négatif) et la Figure 4C représente un grain de riz transformé par la construction PlAa-PP. Alors qu'aucun signal n'est observé pour le grain de riz

sauvage (Fig.4B), le grain de riz transformé par la construction PA1a-PP est fortement coloré (apparaissant en gris foncé sur la Figure 4) au niveau de l'embryon du grain (Fig.4C). Des résultats similaires ont également
5 été obtenus avec le riz transformé par la construction PA1a.

L'analyse par Western *in situ* démontre donc que le polypeptide PA1a est exprimé chez les riz transgéniques ayant été transformés par la construction
10 PA1a-PP ou la construction PA1a.

EXEMPLE 3 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE INSECTICIDE DE LA PROTEINE PA1a EXPRIMEE PAR LES RIZ TRANSGENIQUES

1) Sélection des grains de riz transgéniques T2 utilisés pour les tests

15 La comparaison des résultats d'analyses par RT-PCR d'ARN totaux de feuilles des plantes T0, par western *in situ* de grains T1, ainsi que la détermination par Southern blot du profil d'intégration de l'ADN-T dans le génomes de ces mêmes lignées, a permis de sélectionner
20 les événements de transformation génétique, comportant de 1 à 5 copies intègres de l'ADN-T, les plus intéressants, afin d'étudier leurs descendants. Ainsi pour chaque construit PA1a-PP et PA1a, les grains transgéniques T1 des lignées sélectionnées ont été placés sur une solution aqueuse d'hygromycine B (10 à 50 grains sur du papier
25 Whatman N°1 imbibé avec 10 ml d'une solution aqueuse d'hygromycine B à 50mg.L⁻¹) afin de sélectionner les plantules issues de grains dont le gène de résistance à cet antibiotique (*hpt*) était actif et d'éliminer les
30 grains n'exprimant pas le gène *hpt*, ou l'ayant perdu par ségrégation durant la méiose. Les taux de germination des grains transgéniques ont été comparés à ceux des grains provenant du témoin négatif Z2321, semés en présence d'eau, ou sur une solution aqueuse d'hygromycine B. Après
35 7 jours d'incubation en chambre de culture à la lumière,

il est possible d'observer trois cas de figures ; soit les grains transgéniques présentent les signes d'une imbibition normale mais n'ont pas germé, soit ils ont germé, mais les plantules ne dépassent pas 5 mm et leurs systèmes racinaires ne sont pas développés, soit les grains ont germé et les plantules se sont développées normalement, c'est-à-dire similairement aux plantules issues de la germination de grains non transgéniques avec de l'eau. Cette dernière catégorie de plantules transgéniques a été sélectionnée afin d'être transférées en pot et placées en serre de confinement. Ne présentant pas de symptôme d'extinction de l'expression du gène *hpt*, ce qui se serait traduit par un arrêt ou un retard de croissance du système racinaire, des brûlures des feuilles et/ou des racines, ces plantules sont les plus susceptibles d'exprimer correctement le gène d'intérêt. Pour les deux construits PA_{Ala}-PP et PA_{Ala}, les descendants de 50 lignées avec un minimum de trois événements indépendants de transformation par construit, ont été transférées en serre et constituent la population de plantes T1.

Les plantes transgéniques T1 ont fait l'objet d'un test de résistance à l'hygromycine B par application de 2 µl d'une solution à 25mg.mL⁻¹ d'hygromycine B sur une feuille. Les plantes dont les feuilles ne présentaient pas de symptômes (nécrose ou brûlure), suite à l'application de la solution d'hygromycine B, ont été sélectionnées. Les grains T2 issus de ces plantes T1 ont alors été analysés par western *in situ* afin d'évaluer l'expression de la protéine PA_{Ala}.

Les grains T2 exprimant la protéine PA_{Ala} ont été sélectionnés afin d'être testés avec *Sitophilus oryzae*.

2) Test d'activité insecticide sur charançons adultes

Des charançons (*Sitophilus oryzae*) adultes âgés d'une semaine après émergence, sont utilisés pour réaliser les essais.

5 Les données de mortalité, recueillies journalièrement, sont analysées par mesure de survie afin d'obtenir des valeurs de TL50 (Analyse actuarielle, Statview, SAS). Cette durée est définie comme le temps à partir duquel la moitié de la population testée est morte
10 (la mortalité dans les boîtes témoins est généralement nulle). Le protocole est réalisé comme décrit par Louis et al. (2004), avec quelques modifications qui sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Grains entiers

15 Les charançons adultes (20) sont mis en présence de 5 grains de riz entiers à 27,5°C avec une humidité relative variant de 80 à 90% (utilisation de bacs contenant une solution d'eau pure). Les scores de mortalité de *Sitophilus oryzae* sont relevés à partir du
20 deuxième jour puis tous les jours pendant 10 jours. Le contrôle négatif est constitué de grains non-transgéniques (ZZ321) tandis que le contrôle positif est constitué de grains artificiels composés de farine de grains non transgéniques (ZZ321) additionnée de 10% à 20%
25 de farine de pois. *A posteriori*, les boîtes sont analysées pour la déhiscence des grains, et les rares boîtes où des grains ouverts sont identifiés sont éliminées de l'analyse, la survie des adultes y étant artificiellement prolongée. Les bioessais sont réalisés
30 sur les grains entiers des générations T2 et T3 avec la souche sensible Bouriz.

Grains décortiqués, alimentation forcée

Les charançons adultes (30) sont mis en présence de 5 grains de riz décortiqués à 27,5°C avec une
35 humidité relative de 60-65%. Les scores de mortalité de

Sitophilus oryzae sont relevés à partir du deuxième jour, tous les jours pendant 21 jours. Un grain supplémentaire est ajouté en cas de consommation complète du lot. Ce dispositif assure une consommation complète du grain, y compris de ses couches cellulaires externes (alimentation dite forcée ou limitée), alors que la fourniture de graines *ad libitum* (e.g. 10 grains pour 30 individus et 21 jours) entraîne la consommation préférentielle de l'amidon interne, au détriment des couches externes et de l'embryon du grain.

Le contrôle négatif est constitué de grains non transgéniques (ZZ321) tandis que le contrôle positif est constitué de grains artificiels composés de farine de grains non transgéniques (ZZ321) additionnée de 10% à 20% de farine de pois (Louis et al., 2004). A titre de comparaison, les tests ont été réalisés en parallèle avec des plantes transgéniques exprimant PA1b avec son propeptide (PA1b-PP) ou PA1b seul. Les bioessais sont réalisés sur les grains entiers des générations T2 et T3 avec la souche sensible Bouriz de *Sitophilus oryzae*

La Figure 5 représente le taux de mortalité du charançon *Sitophilus oryzae* observé à 10 jours lors de bioessais réalisés avec des grains entiers (barres d'histogrammes blanches) de génération T2, ou à 21 jours lors de bioessais réalisés avec des grains décortiqués (barre d'histogrammes gris foncé). Le témoin positif (pois), le témoin négatif non transgénique ZZ321 abrégé ZZ, ainsi que les lignées testées sont indiqués en bas de l'histogramme. La ligne grise apparaissant au milieu du graphique représente les valeurs maximales de toxicité obtenues avec des grains non transgéniques. Cette Figure indique que la mortalité des charançons adultes observée sur le témoin non transgénique (grains de ZZ321) est de 50% pour les grains entiers et de 40% pour les grains décortiqués. Des valeurs de toxicité aussi élevées

suggèrent que d'autres facteurs sont intervenus lors de ces bioessais. Il pourrait s'agir de résidus de traitements chimiques présents sur les grains ou encore du taux d'humidité relative appliqué lors de l'expérimentation. Cependant, la présence d'un témoin positif, constitué de farine de grains de riz non transgéniques (variété ZZ321) et de 20% de farine de pois, a permis d'évaluer l'effet du polypeptide PAla dans ces conditions expérimentales et de le comparer à la toxicité des grains transgéniques.

Ces résultats montrent que les lignées transgéniques contenant les transgènes PAla-PP et PAla codant respectivement pour la protéine PAla avec ou sans son propeptide, ont été susceptibles d'induire une mortalité maximale des adultes de *Sitophilus oryzae*, similaire à la mortalité obtenue avec des lignées transgéniques contenant les transgènes PAlb-PP et PAlb codant respectivement pour la protéine PAlb avec ou sans son propeptide.

Ces résultats indiquent que la protéine PAla, produite dans les grains de riz et dans ces conditions expérimentales, est bien toxique pour les adultes de *Sitophilus oryzae*. En outre, ces résultats montrent que le propeptide de PAla n'est pas nécessaire à l'activité insecticide de PAla.

3) Test d'activité insecticide sur larves de charançon

Afin de compléter la caractérisation de la toxicité des lignées transgéniques PAla-PP et PAla, et par la même des construits PAla, un test de développement larvaire a été réalisé avec des grains T2. En parallèle, les mêmes tests ont été réalisés avec les lignées transgéniques exprimant PAlb ou PAlb-PP.

Dans un tube grillagé, 10 grains T2 décortiqués ont été mis en présence de 20 charançons non sexés pendant 3 jours, pour leur permettre de pondre dans les grains. Trois répétitions sont effectuées pour chaque

expérimentation (Boites 1, 2 ,3). Un contrôle de la ponte est effectué après ces 3 jours sur des grains de riz témoin ZZ321 (Boites 1bis, 2bis, 3bis mises en observation sur une durée similaire). Les charançons sont
5 alors mis dans une enceinte climatique pendant 4 semaines sans observations individuelles, et les scores d'émergence journalière sont initiés en début de cinquième semaine, les adultes émergeant chaque jour étant retirés du lot et pesés.

10 La Figure 6 représente le nombre de charançons adultes émergeant après 34 jours de grains de riz T2 lors de tests de développement larvaire réalisés avec des charançons *Sitophilus oryzae*. Les témoins négatif non transgénique Ariete et ZZ321 (abrégé ZZ), ainsi que les
15 lignées testées sont indiqués en bas de l'histogramme. La ligne grise apparaissant au milieu du graphique représente la valeur d'émergence minimale obtenue avec un grain non transgénique.

La Figure 6 indique que les larves contenues
20 dans les grains non transgéniques se sont développées, puis que 9 à 10 adultes matures pour la variété Ariete et 5 à 6 adultes matures pour la variété ZZ321 ont émergé de ces grains. La différence du nombre d'adultes de *Sitophilus oryzae* émergeant à partir des grains non
25 transgéniques pourrait être liée à un effet variétal. Ces résultats obtenus à partir de témoins non transgéniques ont permis de déterminer une limite, représentée par une ligne grise sur le graphique de la Figure 6, correspondant au nombre minimal d'adultes de *Sitophilus*
30 *oryzae* susceptibles d'émerger « normalement » d'un grain de riz.

Ces résultats indiquent que les grains de toutes lignées des construits PA1a-PP et PA1a testés ont
35 généré des résultats d'émergence d'adultes de *Sitophilus oryzae* équivalents à ceux du témoin non transgénique ZZ321.

En revanche, ces résultats montrent que les lignées des construits PA1b exprimant la protéine PA1b avec ou sans son propeptide semble capable de limiter efficacement l'émergence d'adultes de charançons. Ceci
5 indique que la protéine PA1a serait toxique uniquement pour les insectes adultes de *Sitophilus oryzae*, et donc que le mécanisme de toxicité (mode d'action et effet dose) de cette protéine serait différent de celui lié à l'entomotoxine PA1b.

REVENDICATIONS

1) Procédé pour améliorer la résistance d'une plante aux attaques d'insectes ravageurs, caractérisé en ce que l'on exprime dans ladite plante une séquence codant pour une protéine PAla, placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié dans une cassette d'expression ne comprenant pas de séquence codant pour une protéine PAlb.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits insectes ravageurs sont des insectes ravageurs des grains.

3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que le ladite cassette d'expression comprend une séquence codant pour une protéine PAla dont la séquence des 28 acides aminés N-terminaux possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence des 28 acides aminés N-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence des 28 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PAla est définie par la séquence générale (I) suivante (SEQ ID NO : 11) :

X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-S-G-X₁₄-F-C-X₁₅-X₁₆X₁₇-P-N-X₁₈

dans laquelle H, C, K, S, G, F, P et N ont leur signification usuelle en code 1-lettre ;

X₁ représente un acide aminé choisi parmi l'aspartate, le glutamate et la lysine, et de préférence parmi le glutamate et l'aspartate ;

X₂ représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la glutamine, l'aspartate, le glutamate, la lysine ; de préférence X₂ représente le glutamate ;

5 X₃ représente un acide aminé choisi parmi la proline, la leucine et l'alanine ; de préférence X₃ représente la proline ;

X₄ représente l'asparagine ou l'histidine, de préférence l'asparagine ;

10 X₅ représente la leucine ou l'isoleucine, de préférence la leucine ;

X₆ représente un acide aminé choisi parmi la glutamine, le glutamate et la lysine, de préférence parmi la glutamine ou le glutamate ;

15 X₇ représente la sérine ou la thréonine, de préférence la sérine ;

X₈ représente un acide aminé choisi parmi l'asparagine, l'aspartate et l'histidine ; de préférence X₈ représente l'aspartate ;

20 X₉ représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la valine, la leucine, l'aspartate et le glutamate, de préférence parmi l'alanine ou l'aspartate ;

X₁₀ représente l'aspartate ou le glutamate ;

25 X₁₁ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'arginine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, et la thréonine, de préférence parmi l'arginine ou la lysine ;

X₁₂ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'asparagine et le glutamate ; de préférence X₁₂ représente la lysine ;

30 X₁₃ représente un acide aminé choisi parmi la glycine, le glutamate et l'arginine ; de préférence X₁₃ représente la glycine ;

35 X₁₄ représente un acide aminé choisi parmi la lysine, l'asparagine, la thréonine, la sérine et l'aspartate, de préférence parmi la lysine, l'asparagine, ou la thréonine ;

X₁₅ représente la glycine ou l'alanine ;

X₁₆ représente l'histidine ou l'arginine ;

X₁₇ représente la tyrosine ou la phénylalanine,
de préférence la tyrosine ;

5 X₁₈ représente un acide aminé choisi parmi la
proline, l'asparagine, l'aspartate, l'histidine et
l'alanine, de préférence parmi la proline ou l'asparagine

5) Procédé selon une quelconque des
10 revendications 3 à 4, caractérisé en ce que la séquence
des 31 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PAla
possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par
ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%,
80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de
15 préférence au moins 70%, et par ordre croissant de
préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de
similarité avec la séquence des 31 acides aminés N-
terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1.

20 6) Procédé selon la revendication 5,
caractérisé en ce que la séquence de 31 acides aminés N-
terminaux est définie par la séquence générale (II)
suivante (SEQ ID NO : 12) :

X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-S-G-X₁₄-F-C-
25 X₁₅-X₁₆X₁₇-P-N-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁

dans laquelle X₁ à X₁₈ sont tels que définis
dans la revendication 4,

H, C, K, S, G, F, P et N ont leur
signification usuelle en code 1-lettre, et :

30 X₁₉ représente un acide aminé choisi parmi la
glycine, l'aspartate ou la tyrosine, de préférence parmi
la glycine ou l'aspartate ;

X₂₀ représente une isoleucine ou une
méthionine, de préférence une isoleucine ;

35 X₂₁ représente l'aspartate ou le glutamate, de
préférence l'aspartate.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que la séquence des 36 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PAla possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence des 36 acides aminés N-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1.

8) Procédé selon la revendication, caractérisé en ce que la séquence de 36 acides aminés N-terminaux est définie par la séquence générale (III) suivante (SEQ ID NO : 13) :

X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-S-G-X₁₄-F-C-X₁₅-X₁₆X₁₇-P-N-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-G-W-C-F

dans laquelle X₁ à X₂₁ sont tels que définis dans les revendications 4 et 6,

H, C, G, K, S, G, F, P, W, et N ont leur signification usuelle en code 1-lettre, et X₂₂ représente une tyrosine ou une histidine, de préférence une tyrosine.

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisé en ce que la séquence des 42 acides aminés N-terminaux de ladite protéine PAla possède au moins 55%, de préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence des 42 acides aminés N-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID NO : 1.

10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la séquence de 42 acides aminés N-terminaux est définie par la séquence générale (IV) suivante (SEQ ID NO : 14):

5 X₁-X₂-H-X₃-X₄-X₅-C-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-C-X₁₁-X₁₂-K-X₁₃-S-G-X₁₄-F-C-X₁₅-X₁₆X₁₇-P-N-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-G-W-C-F-X₂₃-S-X₂₄-X₂₅-X₂₆-A

dans laquelle X₁ à X₂₂ sont tels que définis dans les revendications 4, 6 et 8,

10 A, H, C, G, K, S, G, F, P, W, et N ont leur signification usuelle en code 1-lettre, et :

X₂₃ représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par l'alanine, la glycine, la sérine et l'aspartate, de préférence l'alanine ;

15 X₂₄ représente un acide aminé choisi dans la groupe constitué par la lysine, l'asparagine et l'aspartate, de préférence la lysine ;

X₂₅ représente la sérine ou la phénylalanine, de préférence la sérine ;

20 X₂₆ représente le glutamate ou la lysine, de préférence le glutamate.

11) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 10, caractérisé en ce que la séquence de ladite protéine PA1a possède au moins 55%, de
25 préférence au moins 60%, et par ordre croissant de préférence, au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 70%, et par ordre croissant de préférence, au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 98% de similarité avec la séquence
30 SEQ ID NO : 1.

12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite protéine PA1a est définie par la séquence générale (V) suivante (SEQ ID NO : 15) :

$X_1-X_2-H-X_3-X_4-X_5-C-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-C-X_{11}-X_{12}-K-X_{13}-$
 $S-G-X_{14}-F-C-X_{15}-X_{16}X_{17}-P-N-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-G-W-C-F-X_{23}-S-X_{24}-$
 $X_{25}-X_{26}-A-X_{27}-X_{28}-X_{29}-F-X_{30}-X_{31}-X_{32}-X_{33}-X_{34}-X_{35}-X_{36}$

dans laquelle dans laquelle X_1 à X_{26} sont tels
5 que définis dans les revendications 4, 6, 8 et 10,

A, H, C, G, K, S, G, F, P, W, et N ont leur
signification usuelle en code 1-lettre, et :

X_{27} représente un acide aminé choisi dans le
groupe constitué par le glutamate, la glutamine, la
10 tyrosine et la leucine ; de préférence X_{27} représente le
glutamate ;

X_{28} représente un acide aminé choisi parmi le
glutamate, l'aspartate, et la lysine ; de préférence X_{28}
représente l'aspartate ;

15 X_{29} représente un acide aminé parmi la
glycine, la valine et la phénylalanine, de préférence
parmi la valine et la phénylalanine ;

X_{30} représente un acide aminé choisi parmi la
sérine, la leucine et la phénylalanine ; de préférence X_{30}
20 représente la sérine ;

X_{31} représente un acide aminé choisi parmi la
lysine, l'asparagine et l'alanine ; de préférence X_{31}
représente la lysine ;

X_{32} représente un acide aminé choisi dans le
25 groupe constitué par l'isoleucine, la valine et la
méthionine ; de préférence X_{32} représente l'isoleucine ;

X_{33} représente un acide aminé choisi dans le
groupe constitué par la thréonine, la sérine et la
proline ; de préférence X_{33} représente la thréonine ;

30 X_{34} représentant un acide aminé choisi dans le
groupe constitué par la glutamine, la proline, la sérine
et l'arginine ; de préférence X_{34} représente la glutamine
ou la proline ;

X_{35} représentant un acide aminé choisi dans le
35 groupe constitué par la lysine, l'asparagine et
l'alanine ; de préférence X_{35} représente la lysine ;

X₃₆ représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par l'aspartate, l'arginine, la proline et la thréonine ; de préférence X₃₆ représente l'aspartate.

5

13) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que ladite protéine PA1a est choisie parmi le groupe constitué de SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO :
10 5, SEQ ID NO : 6 et SEQ ID NO : 7.

14) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que ladite protéine PA1a est modifiée par l'addition à son extrémité
15 N-terminale d'un peptide de 2 à 10 résidus.

15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit peptide est le dipeptide methionine-Asparagine.

16) Cassette d'expression comprenant une
20 séquence codant pour une protéine PA1a, telle que définie dans les revendications 1 à 15, et ne comprenant pas de séquence codant pour une protéine PA1b.

17) Vecteur recombinant comprenant une
25 cassette d'expression selon la revendication 16.

18) Cellule comprenant une cassette d'expression selon la revendication 16.

19) Plante transgénique comprenant une
30 cassette d'expression selon la revendication 16.

20) Procédé d'obtention d'une plante transgénique exprimant une protéine PA1a, caractérisé en
35 ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- la transformation de cellules végétales par une cassette d'expression, selon la revendication 16 ;
- la régénération de plantes à partir des cellules transformées ;
- 5 - la sélection des plantes ayant intégré dans leur génome ladite cassette d'expression.

[illegible]

Figure 1

2/6

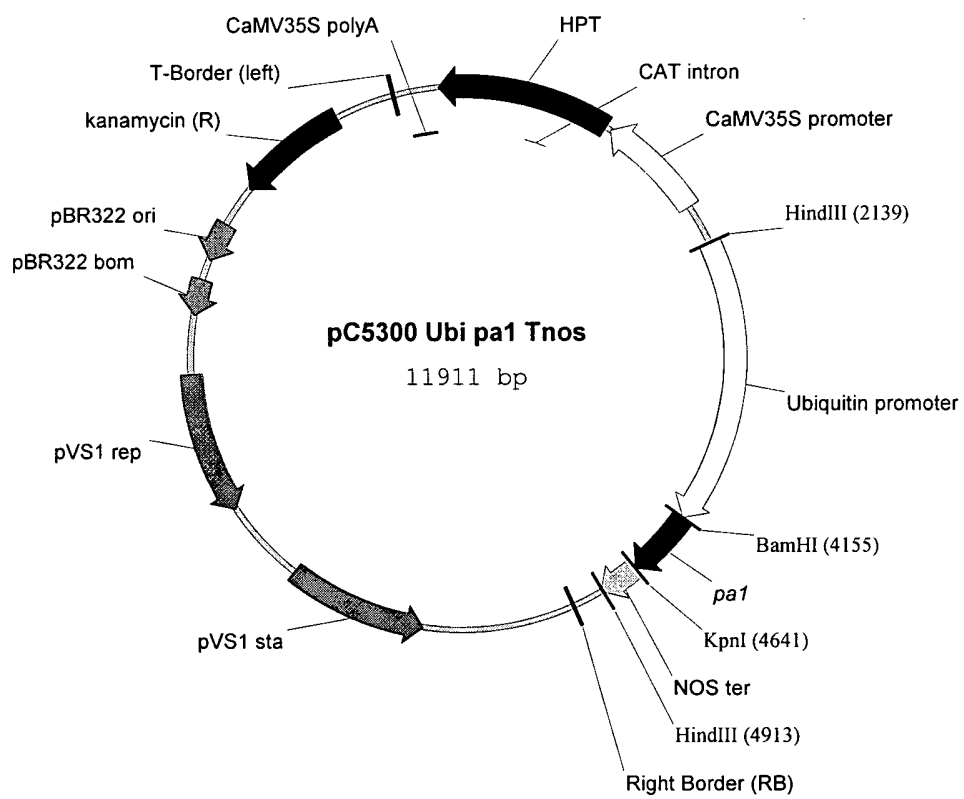


Figure 2

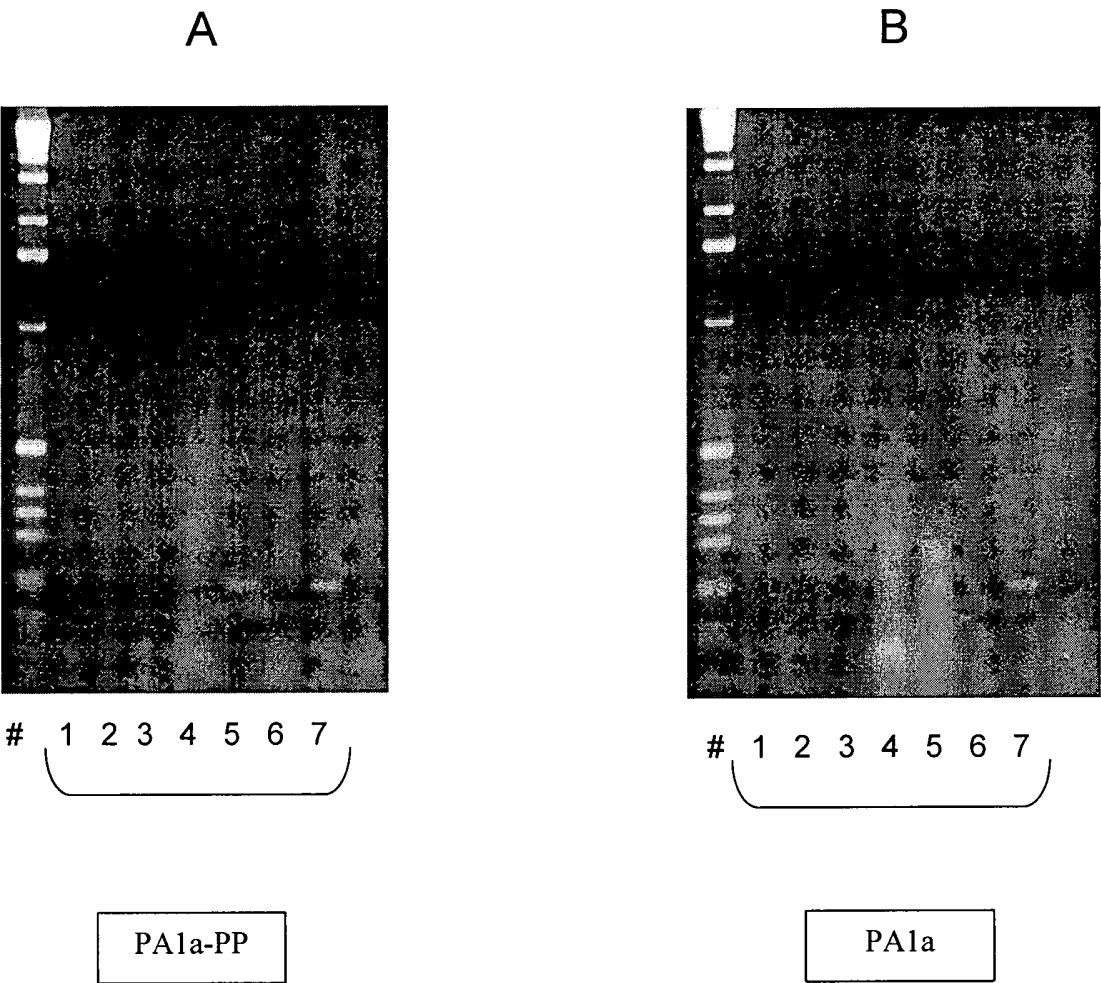
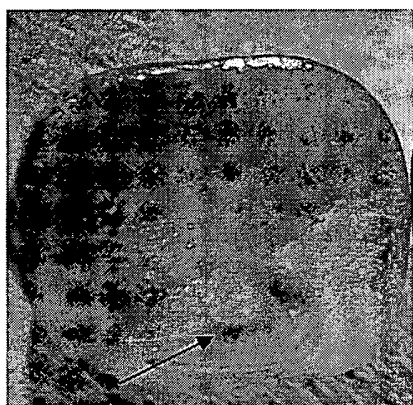


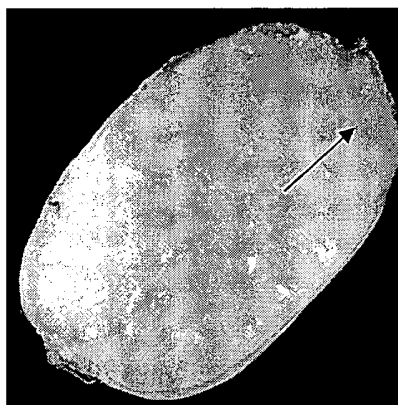
Figure 3

4/6

A



B



C

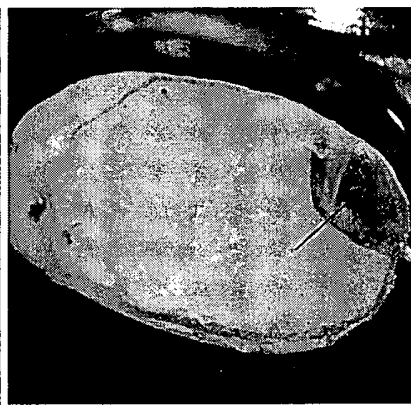


Figure 4

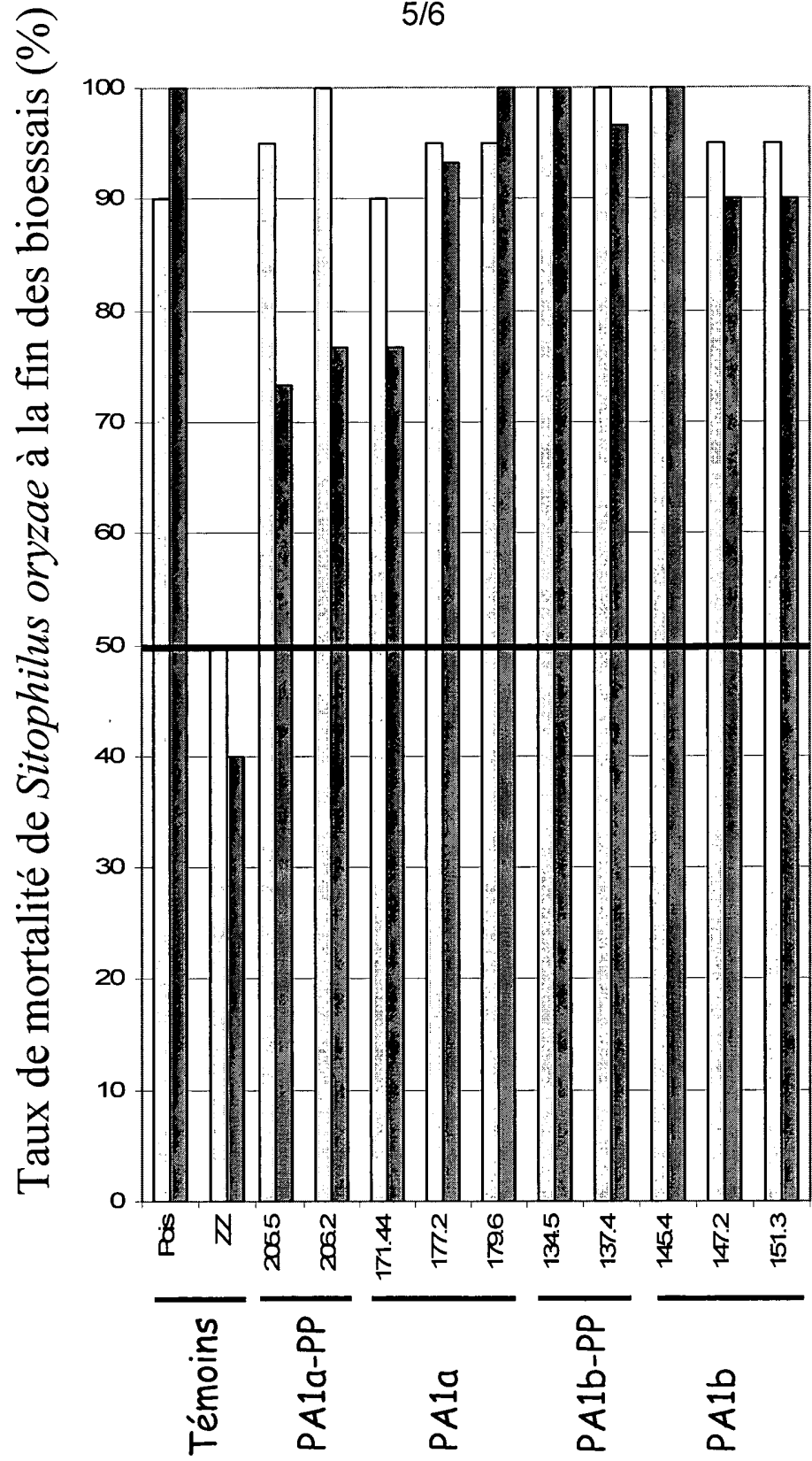


Figure 5

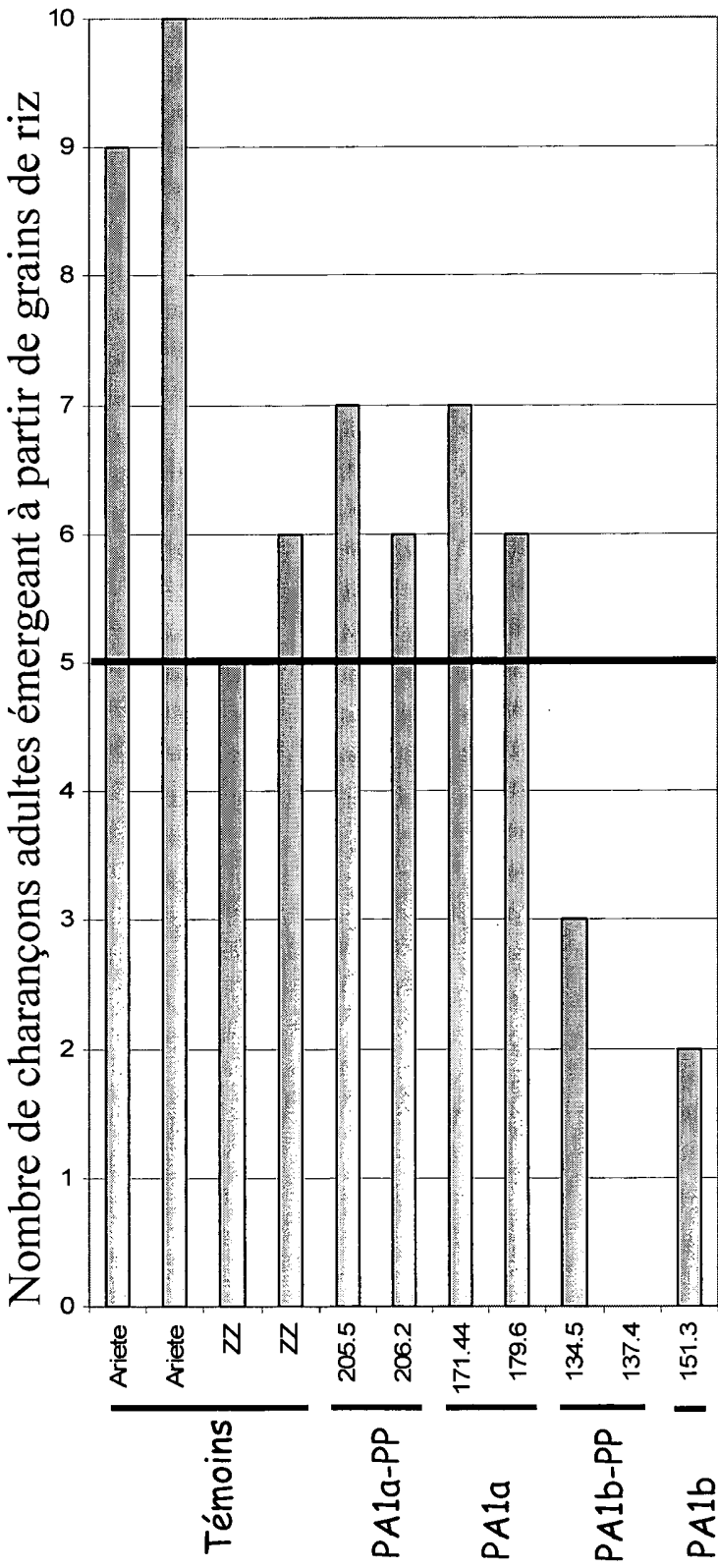


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/001785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/82 A01H5/00 C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/58695 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; INST NAT SCIENCES APPLIQ [FR]; DELOBEL) 18 November 1999 (1999-11-18)	
A	LOUIS ET AL: "Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the Alb-like knottin peptide entomotoxins" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 68, no. 4, 3 February 2007 (2007-02-03), pages 521-535, XP005872732 ISSN: 0031-9422 ----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 juillet 2008

Date of mailing of the international search report

29/07/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, Jürg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2007/001785

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EALING P M ET AL: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco"</p> <p>TRANSGENIC RESEARCH, LONDON, GB, vol. 3, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 344-354, XP002091349 ISSN: 0962-8819</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p>A</p> <p>BEROT ET AL: "Centrifugal partition chromatography as a tool for preparative purification of pea albumin with enhanced yields"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 845, no. 2, 12 January 2007 (2007-01-12), pages 205-209, XP005865230 ISSN: 1570-0232</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members:

International application No

PCT/FR2007/001785

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9958695	A	18-11-1999	AT 272120 T 15-08-2004
		AU 3529199 A	29-11-1999
		CA 2328590 A1	18-11-1999
		DE 69918979 D1	02-09-2004
		DE 69918979 T2	21-07-2005
		EP 1078085 A1	28-02-2001
		ES 2226374 T3	16-03-2005
		FR 2778407 A1	12-11-1999
		US 2008086786 A1	10-04-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/001785

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C12N15/82 A01H5/00 C12N15/29

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 99/58695 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; INST NAT SCIENCES APPLIQ [FR]; DELOBEL) 18 novembre 1999 (1999-11-18)	
A	LOUIS ET AL: "Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the Alb-like knottin peptide entomotoxins" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 68, no. 4, 3 février 2007 (2007-02-03), pages 521-535, XP005872732 ISSN: 0031-9422	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juillet 2008

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/07/2008

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bilang, Jürg

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/001785

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EALING P M ET AL: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco"</p> <p>TRANSGENIC RESEARCH, LONDON, GB, vol. 3, 1 janvier 1994 (1994-01-01), pages 344-354, XP002091349 ISSN: 0962-8819</p> <p>-----</p>	
A	<p>BEROT ET AL: "Centrifugal partition chromatography as a tool for preparative purification of pea albumin with enhanced yields"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 845, no. 2, 12 janvier 2007 (2007-01-12), pages 205-209, XP005865230 ISSN: 1570-0232</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/001785

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9958695	A	18-11-1999	AT 272120 T 15-08-2004
		AU 3529199 A	29-11-1999
		CA 2328590 A1	18-11-1999
		DE 69918979 D1	02-09-2004
		DE 69918979 T2	21-07-2005
		EP 1078085 A1	28-02-2001
		ES 2226374 T3	16-03-2005
		FR 2778407 A1	12-11-1999
		US 2008086786 A1	10-04-2008